

(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND

DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift

(10) DE 40 37 724 A 1

(51) Int. Cl. 5:
G 01 N 33/53
G 01 N 33/577

DE 40 37 724 A 1

(21) Aktenzeichen: P 40 37 724.5
 (22) Anmeldetag: 27. 11. 90
 (23) Offenlegungstag: 20. 6. 91

(30) Unionspriorität: (22) (33) (31)

18.12.89 US 456982

(71) Anmelder:

Princeton Biomeditech Corp., Somerset, N.J., US;
Miwon Co. Ltd., Seoul/Soul, KR

(74) Vertreter:

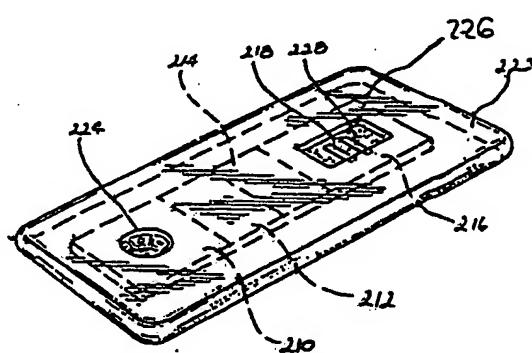
Kuhnen, R., Dipl.-Ing.; Wacker, P., Dipl.-Ing.
Dipl.-Wirtsch.-Ing.; Fürniss, P., Dipl.-Chem.
Dr.rer.nat.; Brandl, F., Dipl.-Phys.; Pat.-Anwälte;
Hübner, H., Dipl.-Ing., Rechtsanw., 8050 Freising

(72) Erfinder:

Kang, Jemo, Princeton, N.J., US; Youn, Byungwoo,
Wyckoff, N.J., US; Oh, Young Ho, Edison, N.J., US

(54) Vorrichtungen für Immunoassays und deren Materialien

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung vom
Migrationstyp (migration type) zum Nachweis des Vor-
handenseins eines Analyten in einer Probe einer biologischen
Flüssigkeit durch Verwendung von immunchemischen
Ligand-Rezeptor-Reaktionen und von speziell ausgewählten,
speziell behandelten und speziell angeordneten Filterma-
terialien.



DE 40 37 724 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine immunchemische Assayvorrichtung gemäß Anspruch 1, einen immunchemisch aktiven Marker gemäß Anspruch 21, ein Verfahren zur Herstellung des immunchemisch aktiven Markers gemäß

5 Anspruch 44, sowie eine immunchemische Testvorrichtung gemäß Anspruch 52.

Es wurden bereits verschiedene Methoden zum Nachweis eines Analyten (die zu analysierende Substanz) in einer Probe einer biologischen Flüssigkeit mittels Anwendung der Immunchemie beschrieben. Bei der sogenannten "Sandwich-Methode" bindet beispielsweise ein Zielanalyt (z. B. ein Antigen) zwischen einem markierten Antikörper und einem Antikörper, der an einem festen Träger immobilisiert ist. Der Nachweis im Assay erfolgt dadurch, daß die Anwesenheit und die Menge des Komplexes aus gebundenem Antigen und markiertem Antikörper ermittelt werden kann. Bei der Konkurrenzmethode eines Immunoassays (competition immunoassay) wird ein Antikörper, der an eine feste Oberfläche gebunden ist, mit einer Probe, die sowohl eine unbekannte Menge des zu analysierenden Antigens als auch markiertes Antigen desselben Typs enthält, in Kontakt gebracht. Anschließend wird die Menge des markierten Antigens, das an die feste Oberfläche gebunden hat, bestimmt, womit indirekt die Menge des zu analysierenden Antigens in der Probe ermittelt werden kann.

10 Da mit obigen und anderen Methoden, die unten noch diskutiert werden, sowohl Antikörper als auch Antigene nachgewiesen werden können, spricht man allgemein von immunchemischen Ligand-Rezeptor-Assays oder einfacher Immunoassays.

15 Vorrichtungen für Festphasen-Immunoassays, ob vom Sandwich- oder Konkurrenztyp, ermöglichen einen empfindlichen Nachweis eines Analyten in einer biologischen Flüssigkeit wie Blut oder Urin. Vorrichtungen für 20 Festphasen-Immunoassays beinhalten einen festen Träger, an den entweder der Ligand oder der Rezeptor des Ligand-Rezeptorpaars, üblicherweise ein Antikörper, Antigen oder Hapten, gebunden wird. Die festen Träger waren früher in Form von Platten, Röhren oder Perlen aus Polystyrol, die vom Gebiet der Radioimmunoassays oder 25 Enzymimmunoassays her bekannt waren, ausgebildet. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von porösen Materialien wie Nylon, Nitrozellulose, Zelluloseacetat, Glasfasern und andere poröse Polymere als Festphasen eingesetzt.

Es wurden bereits viele verschiedene Komplett-Kits für Immunoassays beschrieben, die poröse Materialien 30 als Festphasenträger für immunchemische Komponenten wie Antigene, Haptene oder Antikörper verwenden. Diese Kits sind für gewöhnlich so konzipiert, daß sie auf Basis des Eintauchens, des Durchflusses oder auf Basis der Migration arbeiten (dipstick immunoassay, flowthrough immunoassay, migratory immunoassays).

35 In den allgemeineren Formen von Tauchstabassays (typische Beispiele sind Kits für Heimtests auf Schwangerschaft und für Tests zum Nachweis eines Eisprungs) sind die immunologisch aktiven Komponenten – wie z. B. Antikörper – an eine feste Phase gebunden. Die Testanordnung wird zur Inkubation in eine Probe "eingetaucht", die vermutlich einen unbekannten Antigen-Analyten enthält. Gleichzeitig, oder aber nach einer Inkubationszeit, werden enzymmarkierte Antikörper hinzugegeben. Als nächstes wird das gesamte System gewaschen und dann in eine zweite Lösung gegeben, die ein Substrat für das Enzym enthält. Falls der Enzymmarker vorhanden ist, bildet er aus dem Substrat ein farbiges Produkt, das entweder auf die feste Phase als Feststoff ausfällt oder einen sichtbaren Farbwechsel in der Substratlösung erzeugt. Baxter et al., EP-A 01 25 118 offenbaren einen solchen Tauchstabimmunoassay vom Sandwichtyp. Kali et al., EP-A 02 82 192 offenbaren ein Ein- 40 tauchstäbchen für die Anwendung in Assays vom Konkurrenztyp.

45 Vorrichtungen für Durchflußimmunoassays wurden entwickelt, um langandauernde Inkubationsschritte und lästige Waschschritte, wie sie bei Tauchstabassays auftreten, zu vermeiden. Valkirs et al., U.S. Patent Nr. 46 32 901, offenbaren eine Vorrichtung, die Antikörper (spezifisch für einen Zielantigen-Analyten) enthält, die an eine poröse Membran oder an einen porösen Filter gebunden sind, zu welchen eine flüssige Probe gegeben wird.

50 Während die Flüssigkeit durch die Membran fließt, bindet der Zielanalyt an den Antikörper. Der Zugabe der Probe folgt eine Zugabe von markierten Antikörpern. Der sichtbare Nachweis markierter Antikörper zeigt die Anwesenheit von Zielantigen-Analyten in der Probe auf.

Korom et al., EP-A 02 99 359, offenbaren eine Variante für die Durchfluß-Vorrichtung, bei der sich die markierten Antikörper auf einer Membran befinden, die als Reagenzliefersystem fungiert.

55 Die Notwendigkeit von vielen Zugabeschritten und von Waschschritten bei Vorrichtungen für Tauchstabimmunoassays und Durchflußimmunoassays erhöhen die Wahrscheinlichkeit, daß wenig ausgebildetes Personal und Laien fehlerhafte Testergebnisse erhalten werden.

60 In Assays vom Migrationstyp wird eine Membran mit den Reagenzien getränkt, die für die Durchführung des Assays unabdingbar sind. Dabei ist eine Analyt-Nachweiszone vorgesehen, auf der der markierte Analyt gebunden ist und der Assay gelesen wird. Siehe hierzu z. B. Tom et al., U.S. Patent Nr. 47 70 853 und Zuk, EP-A 01 43 574.

65 Die Empfindlichkeit eines Assays vom Migrationstyp wird jedoch häufig durch die Anwesenheit oder die Bildung von unerwünschten, festen Substanzen in der Probe verringert, die den Fluß der markierten Analyten zu der Detektionszone blockieren. Die Assay-Empfindlichkeit verringert sich auch, wenn ein Assay vom Migrationstyp mit zuviel flüssiger Probe überschwemmt wird.

70 Assays vom Migrationstyp beinhalten für gewöhnlich Reagenzien, die an farbige Marker gebunden sind und damit einen sichtbaren Nachweis ohne Zugabe weiterer Substanzen ermöglichen. Siehe hierzu z. B. Bernstein U.S. Patent Nr. 47 70 853, May et al. WO 88/08 534 und Ching et al. EP-A 02 99 428.

75 Derartige Marker sind unter anderem Goldsol-Partikel, wie sie von Leuvering in U.S. Patent Nr. 43 13 734 beschrieben wurden, Farbstoffsol-Partikel, wie sie von Gribnau et al. in U.S. Patent Nr. 43 73 932 und May et al. WO 88/08 534 beschrieben wurden, angelärbtes Latex, wie es von May, WO 88/98 534, Snyder EP-A 02 80 559 und 02 81 327 beschrieben wurde, und Farbstoffe, die von Liposomen umhüllt sind, wie von Campbell et al. U.S. Patent Nr. 47 03 017 beschrieben. Diese farbigen Markierungssubstanzen sind im allgemeinen durch die für den

entsprechenden Fall geeigneten Immobilisationsmethoden beschränkt. Darüber hinaus benötigen sie eine ziemlich große Menge an Ligandmolekülen und können teure Reagenzien notwendig machen, die dann die Kosten erhöhen.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, vorteilhafte Möglichkeiten zur Durchführung von Immunassays zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird gemäß der vorliegenden Erfindung durch eine Vorrichtung zum Nachweis der Anwesenheit eines Analyten in einer Probe einer biologischen Flüssigkeit gelöst, wobei immunchemische Ligand-Rezeptor-Reaktionen und speziell ausgewählte, speziell behandelte und speziell angeordnete Filtermaterialien verwendet werden.

Genauer gesagt, die Lösung dieser Aufgabe erfolgt durch die Merkmale der Ansprüche 1, 21, 44 bzw. 52.

Vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Weitere Einzelheiten, Aspekte und Vorteile der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung unter Bezugnahme auf die Zeichnung. Es zeigt:

Fig. 1 einen Querschnitt durch eine typische einseitig gerichtete Assayvorrichtung;

Fig. 2 einen Querschnitt durch eine zweite Ausführungsform einer einseitig gerichteten Assayvorrichtung;

Fig. 3 einen Querschnitt durch eine typische zweiseitig gerichtete Vorrichtung;

Fig. 4 eine perspektivische Darstellung einer Assayvorrichtung, wie in Fig. 2 abgebildet (dargestellt in gestrichelten Phantomlinien), wobei die Vorrichtung in eine Plastikhülle mit einer einzigen Öffnung eingeschlossen ist;

Fig. 5 eine Draufsicht auf eine mehrseitig gerichtete Assayvorrichtung; und

Fig. 6 eine perspektivische Darstellung einer Assayvorrichtung, wie in Fig. 2 abgebildet (dargestellt in gestrichelten Phantomlinien), wobei die Vorrichtung in eine Plastikhülle mit zwei Öffnungen eingeschlossen ist.

In Bezugnahme auf Fig. 1 sind auf einem Grundgerüst 20 ein Reservepolster 10, ein Filterelement 12 und eine Membran mit Dichtwirkung 16 angeordnet, die eine immobilisierte Substanz enthält, die auf einer Testanzeigezone 18 begrenzt ist. Das Reservepolster 10 weist genügend Porosität und Volumen auf, um eine flüssige Probe, mit der der Assay durchgeführt werden soll, aufzunehmen und zu speichern. Das Filterelement 12 ist angrenzend an und benachbart zu einer im Verhältnis zum Volumen des Polsters 10 ziemlich kleinen Oberfläche des Reservepolsters 10 angeordnet, um den Durchfluß der flüssigen Probe beim Austritt aus dem Reservepolster 10 in das Filterelement 12 hinein zu dosieren.

Auf der definierten Zone 18 der Membran mit Dichtwirkung 16 befindet sich eine immobilisierte Substanz, die jeden spezifischen Ligand-Rezeptor-Komplex in der Probe binden kann, wenn sie durch das Filterelement 12 fließt.

Bei dieser Ausführungsform wird ein Reagenz, das einen spezifischen Ligand-Rezeptor-Komplex bilden kann, zur Probe gegeben, wo es reagiert, um den Komplex zu bilden (in der Annahme, daß die Probe den passenden Analyten enthält); daraufhin wird die Probe mit dem Reservepolster 10 in Kontakt gebracht. Anschließend fließt die Probe durch das Filterelement 12, wo alle unerwünschten Komponenten, die in der Probe vorhanden sein könnten, abgefangen werden, und weiter in die Membran mit Dichtwirkung 16. Falls sich der markierte Analyt in der Probe befindet, bindet er an die Testanzeigezone 18 und erzeugt damit ein mit dem Auge sichtbar nachweisbares Signal.

In der Ausführungsform, wie in Fig. 2 gezeigt, befindet sich auf dem Grundgerüst 20 ein zweites Filterelement 14, zusätzlich zum Reservepolster 10, zum Filterelement 12 und zur Membran mit Dichtwirkung 16. Das Reservepolster 10 weist genügend Porosität und Volumen auf, um eine flüssige Probe, mit der der Assay durchgeführt werden soll, aufzunehmen und zu halten. Das erste Filterelement 12 ist angrenzend an und benachbart zu einer im Verhältnis zum Volumen des Polsters 10 ziemlich kleinen Oberfläche des Reservepolsters 10 angeordnet, um den Durchfluß der flüssigen Probe beim Austritt aus dem Reservepolster 10 in das erste Filterelement 12 hinein zu dosieren. Bei dieser Ausführungsform ist das erste Filterelement 12 gleichmäßig mit einem Reagenz getränkt, das einen spezifischen Ligand-Rezeptor-Komplex bilden kann. Während die flüssige Probe aus dem Reservepolster 10 austritt, kommt sie mit dem Reagenz in Kontakt, womit das erste Filterelement 12 getränkt ist; damit findet auf dem ersten Filterelement 12 die Reaktion statt, bei der ein spezifischer Ligand-Rezeptor-Komplex oder spezifische Ligand-Rezeptor-Komplexe gebildet werden (in der Annahme, daß die Probe den passenden Analyten oder die passenden Analyten enthält). Die Verwendung des ersten Filterelements als Reagenzliefersystem ermöglicht es, auf eine separate Reagenzzugabe zu verzichten.

Das zweite Filterelement 14, das an das erste Filterelement 12 angrenzt und von Reservepolster 10 entfernt angeordnet ist, ist in der Lage, jegliche spezifische Ligand-Rezeptor-Komplexe, die in der flüssigen Probe enthalten sind oder gebildet wurden, durchzulassen, aber darin enthaltene größere Substanzen am Durchfluß zu hindern, welche in der ursprünglichen Probe bereits enthalten waren oder später gebildet wurden, z. B. im ersten Filterelement.

Die Membran mit Dichtwirkung 16 grenzt an das zweite Filterelement 14 an und ist vom ersten Filterelement 12 entfernt angeordnet. Die Membran mit Dichtwirkung 16 weist genügend Porosität und Volumen auf, um einen Großteil der Probe zu absorbieren, die nach dem Durchfluß durch das erste Filterelement 12 und durch das zweite Filterelement 14 auf das Reservepolster 10 gelangt ist.

Auf der definierten Zone 18 der Membran mit Dichtwirkung 16 befindet sich eine immobilisierte Substanz, die jeglichen spezifischen Ligand-Rezeptor-Komplex zu binden vermag, der in der Probe gebildet worden ist bzw. in der Probe enthalten war, die durch das erste Filterelement 12 und das zweite Filterelement 14 geflossen ist.

Im Gebrauch wird eine flüssige Probe auf das Reservepolster 10 der in Fig. 2 dargestellten Vorrichtung gegeben. Die Probe fließt durch das erste Filterelement 12, wo der Zielanalyt an die markierten Reagenzien bindet, falls der Zielanalyt sich in der Probe befindet. Die Probe fließt weiter durch das zweite Filterelement 14,

wo jegliche unerwünschte Komponenten, die sich in der Probe befinden können, abgefangen werden, und schließlich auf die Membran mit Dichtwirkung 16. Ist der markierte Analyt vorhanden, bindet er an die Testanzeigezone 18 und bildet ein mit dem Auge sichtbar nachweisbares Signal.

Des weiteren können "Immunstatus-Assays" durchgeführt werden, indem auf das zweite Filterelement 14 der in Fig. 2 dargestellten Vorrichtung eine Probe gegeben wird. Auf das Reservepolster 10 wird dann eine Pufferlösung gegeben und die Lösung wandert durch das erste Filterelement 12, wo wieder markierte Reagenzien gebildet werden. Die Lösung und die Reagenzien wandern durch das zweite Filterelement 14, wo der Zielanalyt — falls vorhanden — an die markierten Reagenzien bindet, und dann weiter auf die Membran mit Dichtwirkung 16.

Der markierte Analyt — falls vorhanden — bindet dann an die Testanzeigezone 18 und erzeugt ein mit dem Auge sichtbar nachweisbares Signal.

In Bezugnahme auf Fig. 3 befinden sich auf dem Grundgerüst 120 ein gemeinsames Reservepolster 110, erste Filterelemente 112A und 112B, zweite Filterelemente 114A und 114B und Membranen mit Dichtwirkung 116A und 116B, die auf den definierten Testanzeigezonen 118A und 118B immobilisierte Substanzen tragen. Das gemeinsame Reservepolster 110 weist genügend Porosität und Volumen auf, um eine flüssige Probe, mit der der Assay durchgeführt werden soll, aufzunehmen und zu speichern. Die ersten Filterelemente 112A und 112B sind angrenzend an und benachbart zu einer im Verhältnis zum Volumen des Posters 110 ziemlich kleinen Oberfläche des gemeinsamen Reservepolsters 110 angeordnet, um den Durchfluß der flüssigen Probe vom Reservepolster 110 zu den ersten Filterelementen 112A und 112B zu dosieren. Die ersten Filterelemente 112A und 112B sind gleichmäßig mit einem Reagenz getränkt, das einen spezifischen Ligand-Rezeptor-Komplex bilden kann.

Die zweiten Filterelemente 114A und 114B grenzen jeweils an die ersten Filterelemente 112A und 112B an, sind vom gemeinsamen Reservepolster 110 entfernt angeordnet und sind in der Lage, jeden spezifischen Ligand-Rezeptor-Komplex, der in der flüssigen Probe gebildet wurde, durchzulassen, aber größere Substanzen, die sich in der Probe befinden, am Durchfluß zu hindern. Die Membranen mit Dichtwirkung 116A und 116B weisen genügend Porosität und Volumen auf, um einen Großteil der Probe vom gemeinsamen Reservepolster 110 zu absorbieren. Die immobilisierte Substanz auf den Zonen 118A und 118B kann jeden gebildeten, spezifischen Ligand-Rezeptor-Komplex binden.

Im Gebrauch wird eine flüssige Probe auf das gemeinsame Reservepolster 110 gegeben; die Probe wandert durch die ersten Filterelemente 112A und 112B, wo die Zielanalyten — falls in der Probe vorhanden — an die markierten Reagenzien binden, womit sie getränkt sind, wandert durch die zweiten Filterelemente 114A und 114B, wo jegliche unerwünschten Substanzen der flüssigen Probe abgefangen werden, und wandert weiter auf die Membranen mit Dichtwirkung 116A und 116B. Falls markierte Zielanalyten vorhanden sind, binden sie an die Testanzeigezonen 118A und 118B. Damit erlaubt die Ausführungsform der Fig. 3 einen gleichzeitigen und unabhängigen Assay für zwei Analyten oder erlaubt zwei parallele Assays für denselben Analyten, wobei in jedem Fall nur eine einzige Probe benötigt wird.

In Bezugnahme auf Fig. 4 ist eine Assayvorrichtung, wie sie in Fig. 2 dargestellt ist, von einem Gehäuse 222 umgeben. Das Gehäuse 222 weist eine Öffnung 224 auf, die sich direkt über dem Reservepolster 210 befindet und weist außerdem ein Klarsichtfenster 226 auf, das sich direkt über der Testanzeigezone 218 und der Testkontrollanzeigezone 228 befindet. Das Fenster 226 kann eine einfache Öffnung sein, kann aber auch aus einem durchsichtigen Material bestehen, das die Zonen 218 und 228 schützt, aber zugleich Einsicht gewährt. Die flüssige Probe wird durch die Öffnung 224 gegeben und vom Reservepolster 210 absorbiert. Sie wandert dann durch das erste Filterelement 212, das geeignete, markierte Reagenzien enthält, wandert durch das zweite Filterelement 214, wo alle unerwünschten Substanzen aus der Probe zurückgehalten werden und schließlich auf die Membran mit Dichtwirkung 216, wo der markierte Analyt — falls vorhanden — an die Testanzeigezone 218 bindet. Die ungebundenen, markierten Reagenzien binden an die Testkontrollanzeigezone 228. Beide Anzeigezonen 218 und 228 können durch das Fenster 226 betrachtet werden.

In Bezugnahme auf Fig. 5 wird Grundgerüst 320, das aus feuchtigkeitsunempfindlichem Material wie Kunststoff hergestellt ist, durch Unterteiler 322 in eine Vielzahl von gleichen Segmenten 311A, 311B, 311C, 311D, 311E und 311F eingeteilt. Jedes Segment enthält ein erstes Filterelement 312, ein zweites Filterelement 314 und eine Membran mit Dichtwirkung 316, wobei alle auf dem Grundgerüst 320 zwischen den Unterteilern 322 angeordnet sind. Dasselbe oder verschiedene Reagenzien können auf jedes erste Filterelement 312 aufgetragen werden, was entweder Parallelassays in Bezug auf denselben Analyten, oder eine Vielzahl von verschiedenen Assays in Bezug auf dieselbe Probe erlaubt. Jede Membran mit Dichtwirkung 316 enthält eine immobilisierte Substanz, die auf die definierte Testanzeigezone 318 aufgebracht wird und zum Reagenz im ersten Filterelement paßt, das mit dessen entsprechender Membran mit Dichtwirkung verbunden ist. Das gemeinsame Reservepolster 310, auf dem sich die Probe befindet, ist in Bezug auf die Segmente im Zentrum angeordnet.

Im Gebrauch fließt eine auf dem Reservepolster 310 befindliche flüssige Probe gleichzeitig durch das erste Filterelement 312, wo der Zielanalyt — falls vorhanden — an markierte Antikörper bindet. Die Probe fließt dann durch das zweite Filterelement 314 und auf die Membranen mit Dichtwirkung 316, wo markierte Zielanalyten — falls vorhanden — an die entsprechende immobilisierte Substanz auf der Testanzeigezone 318 binden, womit ein mit dem Auge sichtbar nachweisbares Signal erzeugt wird.

Die Ausführungsform aus Fig. 6 kann für "Immunstatus-Assays" verwendet werden. Eine Fig. 2 entsprechende Assayvorrichtung ist in eine Hülle 522 eingeschlossen. Die Hülle 522 weist eine erste Öffnung 524 auf, die sich direkt über dem Reservepolster 510 befindet, weist eine zweite Öffnung 530 auf, die sich direkt über dem zweiten Filterelement befindet, und weist ein Klarsichtfenster 526 auf, das sich direkt über der Testanzeigezone 518 und der Testkontrollanzeigezone 528 befindet.

Das Fenster 526 kann eine einfache Öffnung, kann aber auch aus einem Material sein, das die Zonen 518 und 528 schützt, aber dennoch Einblick gewährt. Im Gebrauch wird eine Probe (z. B. ein Serum) direkt durch die

zweite Öffnung 530 auf das zweite Filterelement 514 gegeben. Auf das Reservepolster 510 wird dann durch die erste Öffnung 524 eine Pufferlösung gegeben; die Lösung fließt durch das erste Filterelement 512, wo markierte Reagenzien gebildet werden. Die Lösung und die Reagenzien wandern durch das zweite Filterelement 513, wo Zielanalyten – falls vorhanden – an die markierten Reagenzien binden, und schließlich auf die Membran mit Dochtwirkung 516. Falls der markierte Analyt vorhanden ist, bindet er dort an die Testanzeigezone 516 und erzeugt ein mit dem Auge sichtbar nachweisbares Signal. Die ungebundenen, markierten Reagenzien binden an die Testkontrollanzeigezone 528. Beide Anzeigezonen 518 und 528 können durch das Fenster 526 betrachtet werden.

Bei allen Ausführungsformen grenzen die Filterelemente und Polster aneinander, bzw. überlappen sich, um die Flußrichtung der Probe über die Berührungsstellen vorzubestimmen. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, wenn die Membran mit Dochtwirkung ein großes Fläche-Dicke-Verhältnis aufweist, wogegen das Filterelement, das daran angrenzt, ein verhältnismäßig kleines Fläche-Dicke-Verhältnis aufweisen sollte. Es ist daher von Vorteil, das angrenzende Filterelement mit der Membran mit Dochtwirkung zu überlappen, damit eine ausreichende Berührung gewährleistet ist.

Man kann eine – im Vergleich zu älteren Assays vom Migrationstyp – Erhöhung der Empfindlichkeit erreichen, indem wenigstens ein Filterelement vor der Testanzeigezone angeordnet wird. Das Filter, das vorgezugsweise so behandelt wurde, daß jegliche anhaftende Hydrophobizität verringert wird, fängt unerwünschte Komponenten aus der flüssigen Probe ab und läßt den markierten Analyten ungehindert durchfließen. Daher bindet eine verhältnismäßig große Menge Analyt an die Testanzeigezone, wodurch sicherere Testergebnisse erhalten werden.

Darüber hinaus kann das zweite Filterelement als ein kontrolliertes System zur Lyse von Zellen fungieren, indem eine Membran mit entsprechender Struktur und Porengröße ausgewählt wird. So ist es beispielsweise in einem "Immunostatus-Assay" für eine Probe aus Vollblut von Vorteil, ein zweites Filterelement zu wählen, das die Unversehrtheit der Vollblutzellen gewährleistet, während Serum durch sie hindurchfließt. Dies verhindert, daß sich die Verfärbung, die bei Blutzellenlyse auftritt, auf die Testanzeigezone ausbreitet.

Wenn die Vorrichtung dazu benutzt wird, einen "Immunostatus-Assay" durchzuführen, kann dieses zusätzliche Filterelement auch dazu dienen, die Probe direkt aufzunehmen. Im allgemeinen werden solche Assays mit Proben aus Vollblut oder Serum durchgeführt, die direkt auf das Filter gegeben werden. Anschließend wird eine Pufferlösung auf das Reservepolster aufgetragen. Typische Pufferlösungen sind unter anderem eine Phosphatpufferlösung, physiologische Kochsalz Lösung, Tris-HCl und Wasser. Beispiele für Antikörper, die auf diese Weise nachgewiesen werden können, sind unter anderem solche, die in Zusammenhang mit AIDS, Röteln, Hepatitis und Lymphozyt-Erkrankungen stehen.

Eine andere Fehlerquelle, die die Testempfindlichkeit verschlechtert, nämlich das Überschwemmen mit Probe, wird auch dadurch vermieden, daß sich das Reservepolster auf der Vorrichtung befindet. Das Reservepolster kann nämlich einen Großteil der Probe speichern, die dann durch die Vorrichtung hindurch dosiert wird, was ein Ergebnis der wirksamen Berührungsstellen zwischen den folgenden Zonen ist. Dieser Aspekt der Erfindung macht sie beispielsweise besonders für Laien geeignet, die die Vorrichtung einfach in einen Urinstrom halten können, ohne eine bestimmte Menge der Probe, die der Vorrichtung verabreicht werden soll, abmessen zu müssen.

Das Reservepolster, das erste Filterelement, das zweite Filterelement und die Membran mit Dochtwirkung können aus allen möglichen Filtermaterialien hergestellt werden. Typische Filtermaterialien für Reservepolster sind unter anderem Materialien, die niedermolekulare Proteine zu binden vermögen, wie z. B. Zellulose, Polyester, Polyurethane und Fiberglas mit einer Porengröße von 0,45–60 µm. Typische Materialien für das erste Filterelement sind unter anderem Zellulosematerialien (z. B. Whatman Papier ET31) oder Fiberglas mit einer Porengröße von 0,45–60 µm. Typische Materialien für das zweite Filterelement sind hydrophile Materialien, die unter anderem Polyurethane, Polyacetat, Zellulose, Fiberglas und Nylon mit einer Porengröße von 0,45–60 µm sein können, sind aber nicht darauf beschränkt. Typische Materialien für die Membran mit Dochtwirkung sind unter anderem Nylon, Zellulose, ein Polysulfon, Polyvinylidendifluorid, Zelluloseacetat, ein Polyurethan, Fiberglas und Nitrozellulose.

Die gesamte Anordnung aus Polstern und Membranen ist auf einem festen Material befestigt, das als Unterlage dient und ermöglicht, daß die Vorrichtung ein Ganzes ist. Diese Unterlage kann aus einer dünnen Platte aus Glas oder Kunststoff sein, die auf eine passende Größe zugeschnitten wird, damit alle Testbestandteile darauf Platz haben, während sie auch dem Assay-Anwender Annehmlichkeit bietet.

Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erlaubt den Nachweis von vielen Analyten in einer einzigen flüssigen Probe, indem sich auf der Vorrichtung mehr als ein Typ von markierten Reagenzien und dieselbe Zahl an verschiedenen, immobilisierten Reagenzien befinden. Die Vorrichtung kann unidirektional betrieben werden, indem eine Vielzahl markierter Reagenzien, womit ein erstes Filterelement getränkt wird, und eine Vielzahl entsprechender, immobilisierter Substanzen verwendet wird, die auf mehreren Testanzeigezonen auf der Membran mit Dochtwirkung definiert sind. Bei der bidirektionalen oder multidirektionalen Ausführungsform sind mehr als ein Satz an Komponenten, wie das erste Filterelement, das zweite Filterelement und die Membran mit Dochtwirkung, mit einer gemeinsamen Reservoir-Vorrichtung verbunden.

Die Reagenzien auf dem ersten Filterelement sind in jedem Fall auf das Element hinauf oder in das Element hinein gegeben und getrocknet oder gefriergetrocknet worden, um sie über den Kontakt mit einer flüssigen Probe wieder zu aktivieren. Andere Reagenzien, die die Spezifität oder die Menge von gebildeten und gebundenen Ligand-Rezeptor-Komplexen erhöhen können und damit die Empfindlichkeit der Testvorrichtung steigern können, können sich auch auf dem Filterpolster oder aber auf dem ersten von zwei Filterpolstern, die auch das Reagenz enthalten, befinden. Diese Hilfsreagenzien sind unter anderem Puffer, Detergenzien und Antikoagulanzien.

Dadurch, daß eine zusätzliche Testanzeigezone, die an die erste Zone angrenzt und entfernt vom zweiten Filterelement angeordnet ist, auf der Membran mit Dachtwirkung zur Kontrolle eingerichtet ist, stellt die Testvorrichtung ein internes Kontrollorgan dar, das anzeigt, ob die flüssige Probe durch die ganze Vorrichtung hindurch gewandert ist. Die Testkontrollanzeigezonen enthalten im allgemeinen immobilisierte Antikörper (wie

5 Anti-Immunoglobuline) für die markierten Reagenzien, die zum Analyten hinzugegeben wurden, oder aber auf das erste Filterelement gegeben wurden. In Bezugnahme auf die Ausführungsform der Fig. 2 wandert beispielsweise eine flüssige Probe durch das erste Filterelement, wo sie das markierte Reagenz wieder aktiviert und es zur Membran mit Dachtwirkung trägt. Das markierte Reagenz, das nicht an den Zielanalyten gebunden hat, bindet an die Testkontrollanzeigezone, wo es eine mit dem Auge sichtbar nachweisbare Anzeige erzeugt, wann

10 der Test beendet ist.

Die gesamte Testvorrichtung, ob sie nun unidirektional, bidirektional oder multidirektional konstruiert ist, kann von einem flüssigkeits-undurchlässigen Kunststoff umhüllt sein. Diese Hülle hat normalerweise über dem Reservoirfilter eine Öffnung, damit Probe aufgegeben werden kann. Die ganze Hülle kann transparent sein, oder aber nur der Teil über der Analyt-Nachweiszone ist durchsichtig, um das Assayergebnis beobachten zu können.

15 Die Vorrichtungen, die von Kunststoff umhüllt sind, sind besonders geeignet und angenehm für die Anwendung in Heimdiagnostik-Kits, aber es können auch andere Materialien wie behandeltes Papier verwendet werden.

Zusätzlich kann die obere Oberfläche, die die Öffnung umgibt, nach unten sich ausdehnend gebogen sein, so daß ein schalengleiches Aufnahmegeräß gebildet wird, das an einem Teil des Reservepolsters endet und fest mit ihm verbunden ist. Dadurch kann die Menge an Probe, die in die Vorrichtung gegeben wird, dosiert werden, und

20 die Probe kann keine Bestandteile der Vorrichtung umgehen.

Die vorliegende Erfindung kann in Assays sowohl vom Konkurrenztyp als auch vom Sandwichtyp eingesetzt werden. Bei Assays vom Konkurrenztyp wird ein zusätzliches, markiertes Antigen (das dasselbe wie das Zielantigen ist) entweder getrennt oder als Teil des ersten Filterelements aufgetragen. Dieses markierte Antigen konkurriert mit dem Probenantigen um die Bindung an die Nachweiszone.

25 Die Diagnostikvorrichtungen und Diagnostikmethoden, die in der vorliegenden Erfindung beschrieben werden, können bei allen Ligand-Rezeptor-Reaktionen eingesetzt werden und sind besonders für solche Reaktionen geeignet, die immunchemisch aktive Komponenten wie Antikörper, Antigene und Haptene beinhalten. In solchen Assays, bei denen der Nachweis von Ligand-bindenden Molekülen, wie Antigene oder Haptene, gewünscht wird, ist sowohl das markierte Reagenz als auch die auf der Testanzeigezone immobilisierte Substanz ein Molekül, das Liganden binden kann. Im spezielleren Fall, wenn die Liganden Antigene sind, ist sowohl das

30 markierte Reagenz als auch das immobilisierte Reagenz ein Antikörper.

Die Antikörper können sowohl monoklonal als auch polyklonal sein; deren Herstellungsverfahren sind Stand der Technik. Bevorzugterweise verwendet man auf dem ersten Filterelement markierte monoklonale Antikörper und auf der Testanzeigezone polyklonale Antikörper, um maximale Anbindung zu erreichen. Es kann jedoch 35 jede Kombination aus monoklonalen und polyklonalen Antikörpern verwendet werden. Im Falle von Heimkits zum Test auf Schwangerschaft und zur Vorhersage eines Eisprungs werden Antikörper gegen menschliches Choriongonatropin bzw. gegen Gelbkörperbildungshormone hergestellt und auf die Vorrichtung aufgebracht.

Bei solchen Beispielen, bei denen der Nachweis von Ligand-bindenden Molekülen wie von Antikörpern gewünscht wird, wird markiertes Anti-Human-Immunoglobulin G aus Mäusen als Reagenz eingesetzt, das, wie oben angeführt wurde, auf das erste Filterelement gegeben werden kann, und das Antigen, das spezifisch für den Zielantikörper ist, wird auf der Testanzeigezone immobilisiert. Jedes natürliche oder synthetische Antigen kann eingesetzt werden, genauso wie Polypeptidketten, die Antigenaktivität aufweisen. Beispiele für Antigene, die auf der Vorrichtung immobilisiert werden können, stehen unter anderem im Zusammenhang mit Röteln, Lymphozyt-Erkrankungen, AIDS, Hepatitis, Toxoplasmose, dem Zytomegalievirus und dem Epstein Barr Virus.

45 In Tests, wo in einer einzelnen Probe der gleichzeitige Nachweis von mehr als einem Antikörper gewünscht wird, da das gleiche markierte Anti-Human-Immunoglobulin (Reagenz) alle menschlichen Antikörper, die in der Probe vorhanden sind, erkennt und bindet, ist es nur notwendig, Antigene für jeden Zielantikörper auf verschiedene Anzeigezonen auf der Membran mit Dachtwirkung zu geben.

Die auf der Vorrichtung eingesetzten Marker können entweder direkt oder indirekt sein. Direkte Marker sind 50 deshalb bevorzugt, da sie keine zusätzlichen Schritte erforderlich machen, um Testergebnisse sichtbar zu machen. Beispiele für direkte Marker sind unter anderem Metallsole, Farbstoffsole, Latexpartikel, Farbindikatoren, farbige Stoffe, die sich in Liposomen befinden, und Nichtmetallsole wie ein Kohlenstoffsol.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung einen immunchemisch aktiven Marker, der besonders für die Anwendung in der oben angeführten Vorrichtung geeignet ist, aber auch in anderen immunchemischen Test 55 verwendet werden kann, und im besonderen einen immunchemisch aktiven Marker, bei dem ein immunologisch aktiver Ligand oder Ligand-bindende Moleküle direkt oder indirekt auf die Oberfläche von feinen Kohlenstoffstaubpartikeln gebunden werden.

Der immunologisch aktive Marker kann schematisch beschrieben werden als C~L oder C~X:L, wobei C der feine Kohlenstoffstaubpartikel ist, " ~ " eine adsorptive Bindung repräsentiert, L eine Komponente ist, die 60 eine Ligandeneinheit oder eine Ligand-bindende Einheit darstellt, X ein Bindungssagens ist und "? eine kovalente Bindung repräsentiert.

L kann aus lediglich der Ligandeneinheit oder der Ligand-bindenden Einheit bestehen, wobei sie in diesen Fällen direkt auf den Kohlenstoff adsorbiert wird. Alternativ kann die Ligandeneinheit oder Ligand-bindende Einheit entweder kovalent oder immunologisch (hier ausgedrückt durch "★") an ein Brückenglied gebunden sein. Zum Beispiel kann die Ligandeneinheit oder Ligand-bindende Einheit kovalent an ein Kupplungssagens – wie Glutaryldehyd – gebunden sein, das selber kovalent an ein Proteinbrückenglied – wie Rinderserumalbumin (BSA) – gebunden ist, das wiederum auf dem Kohlenstoff adsorbiert ist. Gleichfalls kann Avidin oder Streptavidin über Biotin an das Ligandmolekül oder Ligand-bindende Molekül gebunden sein, und das Avidin oder Streptavidin

auf den Kohlenstoffpartikeln adsorbiert sein. Alternativ wird ein Primär-Antikörper, der als Ligand единheit oder Ligand-bindende Einheit dient, immunologisch an einen Sekundär-Antikörper gebunden, und der Sekundär-Antikörper ist auf die Kohlenstoffpartikel adsorbiert. Typische Strukturen der C-L-Ausführung beinhalten daher:

C-(Ligand),
C-(Ligand-bindendes Molekül),
C-(Protein : X : Ligand),
C-(Protein : X : Ligand-bindendes Molekül),
C-(2 · Ak¹)★1 · Ak¹), und
C-(Protein : X : 2 · Ak¹)★1 · Ak¹).

5

10

1) Anmerkung des Übersetzers:
1 · Ak = Primär-Antikörper
2 · Ak = Sekundär-Antikörper

15

In einer zweiten Ausführungsform wird ein Brückenagens Y sowohl auf den Kohlenstoffpartikel adsorbiert als auch kovalent an die Ligand единheit oder Ligand-bindende Einheit gebunden, um einen Marker mit dem allgemeinen Formelausdruck C-Y : L zu bilden. Das Brückenagens Y kann — wie unten vollständiger diskutiert wird — eine einzelne molekulare Spezies Y' sein oder kann eine Zusammensetzung sein, wie Brückenagens : Protein : Brückenagens:

20

C-Y':(Ligand),
C-Y':(Ligand-bindendes Molekül),
C-Y': Protein : X : (Ligand), und
C-Y': Protein : X : (Ligand-bindendes Molekül).

25

Es soll angemerkt werden, daß der prinzipielle Unterschied zwischen den beiden Ausführungsformen der ist, daß in der ersten Ausführungsform ein Ligand, ein Ligand-bindendes Molekül oder Protein (wie ein Antikörper, Rinderserumalbumin oder Avidin) auf Kohlenstoffpartikeln adsorbiert sind, wogegen in der zweiten Ausführungsform eine Verbindung einer speziellen Klasse organischer Verbindungen, das als Brückenagens dient, auf den Kohlenstoffpartikeln adsorbiert ist und kovalent an einen Liganden, an ein Ligand-bindendes Molekül oder ein Protein gebunden ist.

30

Die oben erwähnten Kohlenstoffsole können durch eine Vielzahl von Verfahren hergestellt werden. Der Ligand und die Ligand-bindenden Moleküle können einfach zu einer Suspension der Kohlenstoffpartikel gegeben werden, um Strukturen der Art C-(Ligand) und C-(Ligand-bindendes Molekül) zu bilden. In Beispielen, bei denen der Ligand oder das Ligand-bindende Molekül indirekt gebunden sind, kann die gesamte Nicht-Kohlenstoffpartikel-Struktur — wie (Protein : X : Ligand), (Protein : X : Ligand-bindendes Molekül), (2 · Ab★1 · Ab) oder (Protein : X : 2 · Ab★1 · Ab) — hergestellt und dann zu einer Suspension der Kohlenstoffpartikel zur Adsorption gegeben werden. Alternativ kann ein Endteil der Nicht-Kohlenstoffpartikel-Struktur zuerst an die Kohlenstoffpartikel adsorbiert werden, und der Rest der Nicht-Kohlenstoffpartikel-Struktur kann dann chemisch eingeführt werden. Zum Beispiel kann ein Protein — wie Rinderserumalbumin, Avidin oder Streptoavidin — auf den Kohlenstoffpartikeln adsorbiert und dann an den Liganden oder das Ligand-bindende Molekül gebunden werden, indem zum Beispiel Glutaraldehyd für Rinderserumalbumin oder Biotin für Avidin oder Streptoavidin verwendet wird.

35

40

Auf ähnliche Weise kann ein 2★ Antikörper auf den Kohlenstoffpartikeln adsorbiert werden und ein 1★ Antikörper dann immunologisch angegliedert werden.

45

Brückenreagenzien Y', die für kovalent-bindende Liganden und Ligand-bindende Moleküle, wie Haptene, Antigene oder Antikörper, oder für kovalent-bindende Proteinbrückengruppen geeignet sind, sind unter anderem Immide, Azide, Isothiocyanate, Imidoester und Dialdehyde wie z. B. Maleimid, Succinimid, Phenylazid, Glutaraldehyd, N-Hydroxysuccinimidester, Phenylisothiocyanat, 4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure, 4-N,N-Dimethylaminobenzol-4'-Isothiocyanat, Flourescein-Isothiocyanat, Rhodaminisothiocyanat oder ähnliche.

50

Wie im Falle der ersten Ausführungsform kann die gesamte Nicht-Kohlenstoffpartikel-Struktur, die durch Reaktion des Liganden (oder des Ligand-bindenden Moleküls), eines jeden Brückenproteins und eines jeden Brückenagens hergestellt wird, auf der Oberfläche des feinen Kohlenstoffstaubpartikels adsorbiert werden. Alternativ kann das Brückenreagenz zuerst allein auf dem feinen Kohlenstoffstaubpartikel adsorbiert werden und dann kovalent an den Liganden, das Ligand-bindende Molekül und/oder das Brückenprotein gebunden werden.

55

In jedem der obigen Verfahren ist es im allgemeinen wünschenswert, einen Suspensions-Hilfsstoff, wie zum Beispiel ein Polyalkylenglykol oder ein Polysaccharid, zur wäßrigen Suspension der feinen Kohlenstoffstaubpartikel zu geben. Wie unten ersichtlich wird, werden nach der Bindung des immunologisch aktiven Liganden oder des Ligand-bindenden Moleküls an die feinen Kohlenstoffstaubpartikel ähnliche Substanzen als Schutzagens hinzugefügt. Die Menge, die auf dieser Stufe zugegeben wird, ist daher relativ klein, im allgemeinen nur so groß, daß sie ausreicht, um in der Suspension der Kohlenstoffpartikel wirksam zu werden.

60

Das Bindungsreagenz läßt man dann — entweder gleichzeitig oder hintereinander — sowohl

65

(i) mit dem immunologisch aktiven Liganden oder mit den Ligand-bindenden Molekülen kovalent reagieren, als auch

DE 40 37 724 A1

(ii) auf feine Kohlenstoffstaubpartikeln adsorbieren.

Da es von dem speziellen Brückenreagenz abhängt, wird die Bindungsreaktion im allgemeinen über mehrere Stunden bei pH-Werten von ungefähr 7,0 bis ungefähr 9,5 durchgeführt.

5 Eine Vielzahl von im Handel erhältlichen feinen Kohlenstoffstaubpartikel-Materialien kann verwendet werden, wie z. B. Monarch 1000, 120, oder 880, Vulcan XC72 oder XC72R, oder Regal 250R oder 500R. Die Eignung jeder speziellen Quelle kann leicht bestimmt werden, indem das Material in einem Puffer homogenisiert und die optische Dichte gemessen wird.

10 Der feine Kohlenstoffstaubpartikel mit dem Liganden oder dem Ligand-bindenden Molekül — die kovalent oder passiv gebunden sind — wird bevorzugt mit einem Polyalkylenglykol oder einem Polysaccharid-Schutz-agens behandelt, um die Hydrophobizität zu minimieren und die Fähigkeit zur Dispersion zu maximieren. Geeignete Materialien für einen derartigen Überzug sind Polyethylenglykole, die ein Molekulargewicht von ungefähr 100 bis ungefähr 20 000 — bevorzugt von ungefähr 5000 bis ungefähr 12 000 — aufweisen, und Schutz-Polysaccharide wie Dextran, die ein Molekulargewicht von ungefähr 10 000 bis ungefähr 500 000 — bevorzugt von ungefähr 10 000 bis ungefähr 50 000 — aufweisen. Dieser Überzug kann leicht dadurch erreicht werden, daß der gebundene Kohlenstoffstaub mit einer 0,5% bis 5% — bezüglich Gewicht/Volumen — wäßrigen Lösung des Polyethylenglykols oder Dextrans in Kontakt gebracht wird.

15 In einer weiteren Ausführungsform wird der immunologisch aktive Marker mit wenigstens einem biologisch verträglichen ionischen oder nicht-ionischen Tensid, wie mit einem langkettigen Alkyltrimethylammonium-Salz, Natriumdeoxicholat, Tritons, Tweens, usw. in einem Konzentrationsbereich von ungefähr 0,01 bis ungefähr 0,5% behandelt. Nach jeder solchen Behandlung, von denen es mehrere mit demselben oder mit verschiedenen Typen 20 von Detergentsien geben kann, wird der immunologisch aktive Marker gewaschen, um überschüssiges Detergent zu entfernen.

25 Der erhaltene immunologisch aktive Marker kann dann in ein wäßriges Medium suspendiert werden. Solche wäßrigen Suspensionen des immunologisch aktiven Markers sind besonders geeignet zur Herstellung von Immunoassayvorrichtungen, sowohl von solchen der vorliegenden Erfindung als auch von solchen anderer Aufbauarten. Die wäßrige Suspension beinhaltet bevorzugt wenigstens einen Puffer, um einen pK_s zu erhalten, bei dem der markierte immunologisch aktive Ligand oder das Ligand-bindende Molekül stabil ist; zum Beispiel innerhalb des Bereichs von ungefähr 6 bis ungefähr 9 und bevorzugt von ungefähr 6,5 bis ungefähr 8,5.

30 Die folgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung weiter verdeutlichen.

Verfahren zur Bestimmung der Empfindlichkeit

35 Die Empfindlichkeiten werden in den folgenden Beispielen bestimmt, indem Standardlösungen hergestellt werden, die menschliches Choriogonatropin in Konzentrationen von 25 mIU/ml, 50 mIU/ml, 75 mIU/ml und 100 mIU/ml enthalten. Die Proben (0,15 bis 0,20 ml) des Standards werden auf die Testvorrichtung gegeben und die Empfindlichkeit bestimmt, indem die Fähigkeit der Vorrichtung genutzt wird, eine gegebene Konzentration an menschlichem Choriogonatropin nachzuweisen.

40 Beispiel 1

A) Herstellung des Markers

45 Goldsolpartikel werden in 750 ml destilliertem Wasser aufgelöst, das dann zum Sieden gebracht wird. Hydro-goldsäure (70 bis 75 mg) wird zugegeben und das Sieden wird fünf Minuten fortgesetzt. Natriumcitrat (80 mg), das in 10 ml destilliertem Wasser aufgelöst ist, wird in die Goldlösung gegossen und die Lösung weitere fünf Minuten gekocht. Nachdem man die Lösung auf Raumtemperatur abkühlen ließ, wird deren pH-Wert an einen Bereich angepaßt, der nahe dem isoelektrischen Punkt (bestimmt durch Gel-Elektrophorese) des monoklonalen Antikörpers ist, der gegen menschliches Choriogonatropin-Hormon hergestellt wurde. 20 mg des monoklonalen 50 Antikörpers werden zur Lösung gegeben, die zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt wird. 750 mg Rinderse-rumalbumin werden zugegeben und die Lösung wird ununterbrochen ungefähr 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Addukt aus kolloidalem Gold und monoklonalem Antikörper wird durch 20minütige Zentrifugation bei 10 000 Upm (Umdrehungen pro Minute) in einem GSA-Rotor erhalten, indem der Überstand verworfen wird und das erhaltene Pellet in 30 ml einprozentigem Rinderserumalbumin in einer Phosphatpufferlösung (pH 55 7,4) suspendiert wird. Die Suspension wird dann bei 16 000 Upm 15 Minuten lang in einem Sorvall SS-34-Rotor zentrifugiert. Wieder wird der Überstand verworfen und das Pellet in 15 ml einprozentigem Rinderserumalbu-min suspendiert. Nach einer kurzen Beschallung wird die Suspension durch ein 0,2 μ m Filter gefiltert.

B) Herstellung der Vorrichtung

60 Ein Muster einer voraktivierten Nylonmembran (Pall Immunodyn) mit einer Porengröße von 5 μ m wird auf eine Größe von 180 mm x 25 mm geschnitten und als die Membran mit Dichtwirkung an den unteren Rand einer dünnen Plastikplatte (100 mm x 180 mm) befestigt. Eine Testanzeigezone mit immobilisierten Antikörpern wird auf der Membran bestimmt, indem 36 μ l einer Lösung aus 3 mg/ml Anti-Human-Choriogonatropin-65 Antikörper aus Schafen in 0,1 molarem Natriumphosphatpuffer (pH 7,6) und Sprozentiger Saccharose auf eine Linie gesprührt werden, die ungefähr 1,5 cm vom unteren Rand entfernt ist, indem ein Camag Linomat IV verwendet wird. Nach dem Besprühen wird die Membran 30 Minuten lang bei 37°C getrocknet und dann mit einer Lösung aus 2prozentiger, fettfreier, trockener Milch (Carnation) und 2prozentiger Saccharose in 0,1mola-

rem Natriumphosphatpuffer behandelt. Die Membran wird dann mit 2prozentiger Saccharose in 0,1molarem Natriumphosphat gewaschen und wird dann bei Raumtemperatur ungefähr 12 Stunden zur weiteren Trocknung stehengelassen. Das Grundgerüst und die Membran mit Dichtwirkung können in einem Exsikkator bis zur weiteren Behandlung aufbewahrt werden.

Zwei Zellulosemembranen (Whatman ET31) werden mit einer Lösung aus 0,1molarem Natriumphosphatpuffer (pH 7,4), 0,1% Rinderserumalbumin, 0,5% fettfreier, trockener Milch, 2% Saccharose und 0,05% Natriumazid vorbehandelt und dann 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Das zweite Filterelement und ein Reservepolster werden hergestellt, indem zwei vorbehandelte Zellulosemembranen in einem Vakuumexsikkator eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet werden.

Das erste Filterelement wird hergestellt, indem ein rechteckiges Stück einer Zellulosemembran (Schleicher & Schuell), das 5 mm x 180 mm mißt, bei Raumtemperatur 30 Minuten lang in einer Lösung aus Addukt aus kolloidalem Gold und monoklonalem Anti-Human-Choriogonatropin-Antikörper in einer 0,1molaren Natriumphosphatpuffer (pH 7,6) und 5% Saccharose inkubiert wird. Die Membran wird dann auf eine Glasplatte gegeben, bei 36°C unter konstantem Vakuum in einem Gefriertrockner wärmegetrocknet und trocken in einem Exsikkator bis zur Verwendung aufbewahrt.

Das erste Filterelement wird angrenzend an das zweite Filterelement und das zweite Filterelement wird auf dem Plastikgrundgerüst angrenzend an die Membran mit Dichtwirkung befestigt. Schließlich wird das Reservepolster angrenzend an das erste Filterelement befestigt. Die Plastikplatte wird dann in eine Vielzahl von Streifen von 100 mm Länge und 7,5 mm Breite geschnitten, so daß jeder eine lineare Anordnung aus Reservepolster, erstem Filterelement, zweitem Filterelement und Membran mit Dichtwirkung aufweist.

Beispiel 2

Dasselbe Verfahren wie in Beispiel 1B) wird durchgeführt, außer daß das Material, das für die Membran mit Dichtwirkung verwendet wird, eine Zellulosemembran (Schleicher & Schuell) ist, die eine Porengröße von 12 µm aufweist. Nach dem Liniensprühen mit Antikörpern wird die Membran 24 Stunden in einen Exsikkator gegeben, um maximale Antikörper-Membran-Bindung zu gewährleisten. Die Membran wird dann in einem Puffer zur Inhibition aus 1% Rinderserumalbumin, 0,5% fettfreier, trockener Milch, 5% Trehalose, 0,05% Tween 20 und 0,05% Natriumazid in 0,1molarem Boratpuffer mit einem pH-Bereich von 8,5 bis 9,0 inkubiert. Die inhibierte Membran wird wieder in einem Vakuumexsikkator eine Stunde lang getrocknet und in einem gewöhnlichen Exsikkator bis zur Verwendung in der Testvorrichtung aufbewahrt.

Beispiel 3

Ein Streifen wird entsprechend dem Verfahren in Beispiel 1B) hergestellt.

Wenn ein Urinstrom auf das Reservepolster gegeben wird, beginnt nach ungefähr 3 Minuten ein nachweisbares Signal auf der Assay-Anzeigezone zu erscheinen. Die Testempfindlichkeit ist ungefähr 50 mIU/ml.

Beispiel 4

Ein Streifen wird entsprechend dem Verfahren aus Beispiel 1B hergestellt, wobei das erste Filterelement und das Reservepolster weggelassen werden. Der Streifen wird in ein Röhrchen mit 100 µl weiblichem Urin gegeben, der 10 µl Konjugat aus kolloidalem Gold und monoklonalem Anti-Human-Choriogonatropin-Antikörper aufweist, das in Übereinstimmung mit Beispiel 1 hergestellt wurde. Während die Flüssigkeit den Streifen entlangwandert, erscheint nach ungefähr 2 Minuten ein nachweisbares Signal auf der Testanzeigezone, das stärker wird, wenn die Flüssigkeit das Ende des Streifens (ungefähr 4 Minuten) erreicht hat. Die Empfindlichkeit dieses Testverfahrens für vorhandenes menschliches Choriogonatropin ist 25 mIU/ml.

Beispiel 5

Ein Teststreifen wird im wesentlichen in Übereinstimmung mit dem Verfahren in Beispiel 1B hergestellt, außer daß das erste Filterelement mit Anti-Human-Choriogonatropin-Antikörper behandelt wird, der wie folgt markiert wird. Eine 10prozentige Suspension (0,1 ml) aus im Handel erhältlichen farbigen Polystyrol-Latexpartikeln, die in ihrer Größe von 0,1 bis 0,3 µm reichen, wird dreimal mit destilliertem Wasser durch Mikro-Zentrifugation (microfuge centrifugation) gewaschen. Das Endpellet wird in 2 ml aus 0,1molarem Glycinhydrochloridpuffer suspendiert, der 1 mg Rinderserumalbumin enthält. Nach ungefähr 12 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur auf einer Rüttelvorrichtung wird die Latexsuspension dreimal mit 0,1molarem Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) gewaschen, um überschüssiges Rinderserumalbumin zu entfernen. Die erhaltene Suspension wird mit demselben Phosphatpuffer auf 2 ml verdünnt, und 25% Glutaraldehyd wird hinzugefügt, um eine Endkonzentration von 1% zu erreichen. Die Probe wird drei Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert und noch dreimal mit demselben Puffer gewaschen. 100 µg Anti-Human-Choriogonatropin-Antikörper werden zu 2 ml der Latexsuspension gegeben und weitere drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Glycin wird dann hinzugegeben, um eine Endkonzentration von 2% zu erreichen. Nach einer weiteren Stunde Inkubation wird die Latexsuspension dreimal mit demselben Puffer gewaschen und in denselben Puffer, der 2% Rinderserumalbumin enthält, suspendiert. Die Suspension wird kurz beschallt und dann bei 4°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Beispiel 6

Ein Streifen wird entsprechend dem Verfahren aus Beispiel 1B hergestellt, wobei das erste Filterelement und das Reservepolster weggelassen werden. Der Teststreifen wird dann in ein Teströhrchen gegeben, das in 100 µl weiblichem Urin 5 µl Anti-Human-Chiogonatropin-Antikörper enthält, die in Übereinstimmung mit dem Verfahren in Beispiel 5 markiert sind. Während die Flüssigkeit den Streifen entlangwandert, erscheint nach ungefähr 2 Minuten ein nachweisbares Signal auf der Testanzeigezone, wobei das Signal intensiver wird, wenn die Flüssigkeit das Ende des Streifens erreicht hat (ungefähr 4 Minuten). Die Empfindlichkeit dieses Assay-Verfahrens für menschliches Chriogonatropin beträgt 25 mIU/ml.

10

Beispiel 7

10 mg Vulcan XC72 Kohlenstoffpartikel werden in 2 ml eines 20 mM Trishydrochloridpuffers (pH 6,8) homogenisiert, der 40 mM Natriumchlorid und 2% Dextran 9400 enthält. Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wird eine Lösung aus 5 mg Fluorescein-Isothiocyanat in 1 ml Trishydrochloridpuffer zur Lösung hinzugefügt. Die Mischung wird kurz beschallt und ungefähr 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation werden 20 ml an 0,1molarem Natriumphosphatpuffer (pH 7,6) in 0,1molarem Natriumchlorid zur Kohlenstofflösung hinzugefügt, die dann bei 4°C bei 15 000 Upm zentrifugiert wird. Dieser Schritt wird dreimal wiederholt und das resultierende Pellet in 20 ml Phosphatpuffer suspendiert. Nach kurzer Beschallung werden 3 mg eines monoklonalen Antikörpers gegen menschliches Chriogonatropin zur Suspension gegeben und die Mischung 6 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wird dann dreimal bei 15 000 Upm zentrifugiert, um nicht-reagierte Antikörper zu entfernen. Das Endpellet wird in 20 ml 0,1molarem Hepes-Puffer (pH 7,5) suspendiert, der 1% Rinderserumalbumin, 5% Saccharose, 0,1molarem Natriumchlorid und 0,05% Natriumazid enthält. Cetyltrimethylammoniumbromid wird hinzugefügt, bis eine Endkonzentration von 0,025% erreicht ist. Dies lässt man 30 Minuten inkubieren und wird dann bei 15 000 Upm zentrifugiert. Das resultierende Pellet wird in 20 ml 0,1molarem Hepes Puffer (pH 7,5) suspendiert, der 1% Rinderserumalbumin, 5% Saccharose, 0,1 M Natriumchlorid und 0,05% Natriumazid enthält, kurz beschallt, mit Natriumdeoxylat auf eine Endkonzentration von 0,1% verdünnt, anschließend 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und wieder zentrifugiert. Das Pellet wird wieder in 20 ml 0,1molarem Hepes Puffer (pH 7,5) suspendiert, der 1% Rinderserumalbumin, 5% Saccharose, 0,1 M Natriumchlorid und 0,05% Natriumazid enthält, und kurz beschallt.

Dieses Kohlenstoffsol wird anstelle von kolloidalem Gold auf das erste Filterelement der Teststreifen gegeben, die entsprechend dem Beispiel 1B hergestellt sind, wobei das Reservepolster weggelassen wird. Die Teststreifen werden ungefähr eine Stunde lang in einem Vakuumtrockner getrocknet und bis zur Verwendung in einem Exsikkator bei Raumtemperatur aufbewahrt. Um Tests zum Nachweis von menschlichem Chriogonatropin oder Gelbkörperbildungshormon durchzuführen, werden 100 µl einer Urinprobe in ein Kulturröhrchen dispensiert und der Streifen wird dann in das Röhrchen gegeben. Über den Kontakt mit der Urinprobe werden die Konjugate aus Kohlenstoffpartikel und Antikörper sofort gelöst und wandern auf die Membran mit Dochtwirkung zu. Ein positiver Test entspricht einer intensiven Farbe der Kohlenstoffpartikel, die auf der Anzeige konzentriert sind. Die Nachweisgrenze beträgt sowohl für Tests zum Nachweis von menschlichem Chriogonatropin als auch von Gelbkörperbildungshormon ungefähr 25 mIU/ml.

45

Beispiel 8

Ein Streifen wird entsprechend dem Verfahren aus Beispiel 1B hergestellt, wobei das erste Filterelement und das Reservepolster weggelassen werden. Der Teststreifen wird dann in ein Teströhrchen gegeben, das den Kohlenstoffsol-markierten Antikörper (5 µl) und eine Urinprobe mit menschlichem Chriogonatropin (100 µl) enthält, welche gründlich gemischt werden. Nach ungefähr einer Minute beginnt ein nachweisbares Signal zu erscheinen. Die Empfindlichkeit dieses Assays wurde zu ungefähr 25 mIU/ml bestimmt.

50

Beispiel 9

Kohlenstoffsolreagenzien, die monoklonale Antikörper gegen menschliches Chriogonatropin oder gegen Gelbkörperbildungshormon (5 µl pro Röhrchen) tragen, werden gefriergetrocknet. Das Röhrchen kann bis zum Einsatz in einem Exsikkator bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

55

Um Assays zum Nachweis von menschlichem Chriogonatropin oder Gelbkörperbildungshormon durchzuführen, werden 100 µl einer Urinprobe in einem Kulturröhrchen dispergiert, das das getrocknete oder gefriergetrocknete Kohlenstoffsol enthält. Das Kohlenstoffsol reagiert sofort nach Kontakt mit einer Urinprobe in Lösung. Ein Teststreifen, der wie in Beispiel 1B, aber ohne das erste Filterelement und ohne das Reservepolster hergestellt wurde, und auf den eine Linie aus Anti-Human-Chriogonatropin-Antikörper aus Schafen (3 µg pro Streifen) als Anzeige gesprührt wurde, wird dann in das Röhrchen gegeben. Wenn die wandernde Probenmischung die Anzeige erreicht, beginnt eine schwarze Bande zu erscheinen, falls die Urinprobe menschliches Chriogonatropin oder Gelbkörperbildungshormon enthielt. Die Empfindlichkeit der Tests, die das getrocknete oder gefriergetrocknete Kohlenstoffsol reagenz verwenden, ist in beiden Fällen ungefähr 25 mIU/ml. Das getrocknete oder gefriergetrocknete Kohlenstoffsol reagenz bleibt aktiv und zeigt dieselbe Empfindlichkeit, nachdem es über ein Jahr bei Raumtemperatur gelagert wurde.

Beispiel 10

Eine Testvorrichtung wurde entsprechend dem Beispiel 1B hergestellt, wobei das erste Filterelement und das Reservepolster weggelassen wurden und 1 mg/ml Anti-Tyroxin-Antikörper für das Liniensprühen auf der Membran mit Dachtwirkung verwendet wurden. 5

Durch die Zugabe zu einer Mischung aus 5 µl Tyroxin-tragendem Kohlenstoffsol (siehe Beispiel 21) und 100 µl Serum (Assay vom Konkurrenztyp) beginnt die Kontrollbande nach ungefähr zwei Minuten zu erscheinen. Bei einem Tyroxiniveau (unmarkiert) in der Serumprobe, das höher als ungefähr 60 ng/ml ist, tritt keine Bandenbildung auf (eine schwache Bande erscheint bei 59 ng/ml). Demgegenüber sind weniger als 10 ng/ml an Tyroxin erforderlich, um in Abwesenheit von Tyroxin in der Serumprobe eine Bande zu produzieren, die genauso intensiv wie die Kontrollbande ist. 10

Beispiel 11

Eine Testvorrichtung wurde entsprechend dem Beispiel 1B hergestellt, wobei das erste Filterelement und das Reservepolster weggelassen wurde und 2 mg/ml eines im Handel erhältlichen Lymphozyt-Erkrankung-Antigens (OEM Concepts) für das Liniensprühen auf der Membran mit Dachtwirkung verwendet wurde. 15

Wenn das Reservoir-Ende der Vorrichtung in eine Mischung aus 100 µl menschlichem Serum und 5 µl Kohlenstoffpartikel, die mit einem Konjugat aus Fluorescein-Isothiocyanat und Anti-Human-Immunoglobulin G aus Ziegen (siehe Beispiel 21) markiert sind, getaucht wird, erscheint nach ungefähr 4 Minuten ein nachweisbares Signal, falls die Probe seropositiv ist. 20

Beispiel 12

Eine Testvorrichtung wird entsprechend Beispiel 11 hergestellt. 10 µl menschliches Serum werden auf das zweite Filterelement getupft. Die Vorrichtung wird in ein Röhrchen gegeben, das 100 µl einer Suspension aus Kohlenstoffpartikeln (5 µl) in 20 mM Ethylenediamintetraacetat enthält, wobei die Kohlenstoffpartikeln mit einem Konjugat aus Fluorescein-Isothiocyanat und Anti-Human-Immunoglobulin G aus Ziegen (siehe Beispiel 21) markiert sind. Ein nachweisbares Signal erscheint nach 5 Minuten, falls die Probe seropositiv ist. 25

Beispiel 13

Eine Testvorrichtung wird entsprechend Beispiel 11 hergestellt, außer daß 2 mg/ml Röteln-Antigen (Viral Antigens, Inc.) zum Liniensprühen auf der Membran mit Dachtwirkung verwendet werden. 30

Wenn das Reservepolster mit 100 µl menschlichem Serum und 5 µl Kohlenstoffpartikeln in Kontakt gebracht wird, die mit einem Konjugat aus Fluorescein-Isothiocyanat und Anti-Human-Immunoglobulin G aus Ziegen (siehe Beispiel 21) markiert sind, erscheint nach ungefähr 2 Minuten ein nachweisbares Signal, falls die Probe seropositiv ist. 35

Beispiel 14

Eine Testvorrichtung wird entsprechend Beispiel 13 hergestellt. 10 µl des Serums werden auf das zweite Filterelement getupft und die Vorrichtung wird in ein Röhrchen gegeben, das 100 µl einer Suspension aus Kohlenstoffpartikeln in 20 mM Ethylenediamintetraacetat enthält, wobei die Kohlenstoffpartikel mit einem Konjugat aus Fluorescein-Isothiocyanat und Anti-Human-Immunoglobulin G aus Ziegen (siehe Beispiel 21) markiert sind. Nach ungefähr 3 Minuten erscheint ein nachweisbares Signal, falls die Probe seropositiv ist. 45

Beispiel 15

Eine Testvorrichtung wird entsprechend Beispiel 11 hergestellt und eine zusätzliche Linie mit Röteln-Antigen wird ungefähr 7 mm von der Linie mit Lymphozyt-Erkrankung-Antigen entfernt und parallel dazu gesprührt. 50

Eine Röteln-seropositive Probe (10 µl) wird auf das zweite Filterelement getupft. Die Vorrichtung wird in ein Röhrchen gegeben, das 100 µl einer Suspension aus Kohlenstoffpartikeln (10 µl) in 20 mM Ethylenediamintetraacetat enthält, wobei die Kohlenstoffpartikel mit einem Konjugat aus Fluorescein-Isothiocyanat und Anti-Human-Immunoglobulin G aus Ziegen (siehe Beispiel 21) markiert sind. 55

Nach ungefähr 5 Minuten erscheint entlang der Linie mit Röteln-Antigen ein nachweisbares Signal.

Beispiel 16

Das Verfahren aus Beispiel 15 wird durchgeführt, außer daß eine Röteln- und Lymphozyt-Erkrankung-seropositive Probe (20 µl) auf die Membran getupft wird. Nach ungefähr 5 Minuten beginnen zwei nachweisbare Signale zu erscheinen. 60

Beispiel 17

Die Eignung verschiedener Kohlenstoffmaterialien zur Herstellung der Kohlenstoffsole und der Kohlenstoffpuffer zum selben Zweck kann leicht durch folgende Techniken bestimmt werden. 65

A. Mischungen aus 5 mg verschiedener Kohlenstoffrufe (Monarch 1000, Monarch 880, Monarch 120, Regal

DE 40 37 724 A1

250R, Regal 500R, Vulcan XC72R und Vulcan XC72, die alle von Cabot erhältlich sind) und 100 µl aus 2% Polyethylenglykol (6000 bis 8000) werden 5 Minuten gemahlen und mit Phosphatsalinepuffer, der 2 mg eines monoklonalen Antikörpers gegen menschliches Choriogonatropin enthält, auf 10 ml verdünnt. Nach einer kurzen Beschallung zur Dispersion der Kohlenstoffpartikel in der monoklonalen Antikörperlösung, werden die 5 Mischungen 6 Stunden lang bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert. Am Ende der Inkubation wird die Probe dreimal durch Zentrifugation gewaschen, um jegliche überschüssigen Antikörper zu entfernen. Jede Zentrifugation wird 20 Minuten lang bei 15 000 UpM durchgeführt, wobei 10 ml einer Phosphatpufferlösung verwendet werden. Das Endpellet wird in 10 ml einer 3% Phosphatpufferlösung suspendiert und kurz beschallt, um vollständige Dispersion der Kohlenstoffpartikel zu gewährleisten.

10 Für einen Test zum Nachweis von menschlichem Choriogonatropin werden 20 µl des Kohlenstoffsols und 200 µl einer Urinprobe dispergiert und in einem Kulturröhrchen (10 x 75 mm) gründlich gemischt. Die Mischung lässt man dann in einen Streifen aus Whatman Papier (31ET) wandern, der 5 mm in der Breite und 100 mm in der Höhe misst, mit Anti-Human-Choriogonatropin-Antikörper aus Schafen entlang einer Linie besprüht ist, und der mit 1% Rinderserumalbumin in einer Phosphatpufferlösung (pH 7,4) inhibiert ist.

15 Vulcan XC72 ergibt dabei das beste Signal-Rausch-Verhältnis bei 200 mIU/ml an menschlichem Choriogonatropin. Ähnliche Ergebnisse werden mit Vulcan XC72R erreicht, nur ist das positive Signal etwas schwächer.

20 B. 5 mg derselben Kohlenstoffpartikel werden durch Homogenisierung in 2 ml eines 20 mM Tris-HCl-Puffers (pH 6,8) suspendiert, der 40 mM Natriumchlorid und 2% (w/v) Dextran 9400 enthält. Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wird 1 ml einer 3prozentigen Lösung aus Rinderserumalbumin zur homogenisierten Kohlenstoffpartikel gegeben. Die Mischung wird kurz beschallt und ungefähr 12 Stunden lang bei Raumtemperatur weiter inkubiert. Am Ende der Inkubation werden 5 µl der Mischung in eine Kuvette dispesiert, die 1 ml destilliertes Wasser enthält. Bei jeder Probe wird die Extinktion bei 700 nm gemessen. Die Ergebnisse sind wie folgt:

25	Kohlenstoffrühr-Quelle	Optische Dichte bei 700 nm
	Monarch 1000	0,2333
	Monarch 880	0,3129
	Vulcan XC72R	0,6878
30	Vulcan XC72	0,7428
	Monarch 120	0,6225
	Regal 250R	0,3567
	Regal 500R	0,4372

35 C. Vulcan XC72 Kohlenstoffrühr-Quelle wird in mehrere Pufferlösungen suspendiert, die verschiedene pH-Werte aufweisen. 5 mg Vulcan XC72 Kohlenstoffpartikel werden in 2 ml verschiedener Pufferlösungen homogenisiert, die 2% Dextran 9400 enthalten, und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation werden 5 µl eines jeden Homogenats zu 1 ml destilliertem Wasser gegeben. 1 ml von 3% Rinderserumalbumin im selben Puffer wird zur Mischung hinzugefügt, die dann beschallt wird und ungefähr 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wird. Am Ende der Inkubation werden 5 µl der Mischung in 1 ml destilliertem Wasser suspendiert und die Extinktion bei 700 nm gemessen. Die Ergebnisse sind wie folgt:

45	Puffer	Ionenstärke	pH	optische Dichte bei 700 nm Dextran	Rinderserum- albumin
	Natriumphosphat	0,1 M	6,0	0,3335	0,6030
50	Natriumphosphat	0,1 M	6,8	0,5142	0,7462
	Tris-HCl	0,02M	6,8	0,6277	0,8452
	Natriumphosphat	0,003 M	7,0	0,4722	0,5389
	Natriumphosphat	0,1 M	7,6	0,4348	0,6100
	Tris-HCl	0,02 M	8,0	0,6479	0,5220
55	Glycin-HCl	0,1 M	8,3	0,4666	0,5197
	Tris-Citrat	0,1 M	8,6	0,4284	0,4933

60 Wie oben ersichtlich, sind Pufferlösungen, die pH-Werte von ungefähr 6,8 bis 8,0 aufweisen, besonders geeignet für die Dispersion von Kohlenstoffpartikeln.

Beispiel 18

Zu einer Mischung aus 1 mg Anti-Human-Choriogonatropin-Antikörper in 1 ml 0,3 M Boratpuffer (pH 9,0) wird unter Rühren 50 µg Fluorescein-Isothiocyanat gegeben. Das Rühren wird eine Stunde lang weiter fortgesetzt und die Mischung wird dann auf eine Sephadex-G-25-Säule gegeben, um nicht-reagiertes Isothiocyanat und andere unerwünschte Materialien zu entfernen. Das Verhältnis aus Antikörper : Isothiocyanat ist ungefähr 1 : 3. Zu einer wässrigen Suspension aus 1 mg Kohlenstoffrühr-Quelle (Vulcan 72) werden 0,5 mg des Antikörperkonju-

gats gegeben. Die Mischung wird beschallt, ungefähr 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal der Zentrifugation unterworfen. Das Endpellet, das in einem Puffer suspendiert wird, wie er in Beispiel 12 beschrieben ist, kann bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt werden.

Ähnliche Produkte können erhalten werden, indem Anti-Gelbkörperbildungshormon, Anti-Human-Immunoglobulin G aus Ziegen und Immunoglobulin-M-Antikörper verwendet werden.

5

Beispiel 19

Zu 10 ml einer wäßrigen Suspension aus 5 mg Kohlenstoffruß (Vulcan 72) werden 200 µl Anti-Maus-Antiserum aus Ziegen gegeben. Die Mischung wird beschallt und ungefähr 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wird dann 1 mg Anti-Human-Choriogonatropin-Antikörper gegeben, diese Mischung 2 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal der Zentrifugation unterworfen. Das Endpellet, das in einem Puffer suspendiert wird, wie er in Beispiel 12 beschrieben ist, kann bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt werden.

10

Beispiel 20

15

Zu einer Suspension aus 5 mg Kohlenstoffruß in 10 ml Phosphatpufferlösung (PBS) werden 2 mg Avidin gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur werden 5 ml an 3% Rinderserumalbumin in PBS hinzugefügt. Nach zweistündigem Stehenlassen werden 0,5 mg biotinyliertes Anti-Human-Choriogonatropin in 1% Rinderserumalbumin in PBS hinzugefügt. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation wird die Mischung dreimal der Zentrifugation unterworfen. Das Endpellet, das in einem Puffer, wie er in Beispiel 12 beschrieben ist, suspendiert und dann kurz beschallt wird, kann bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt werden.

20

Beispiel 21

25

10 mg Vulcan XC72 Kohlenstoffpartikel werden in 2 ml eines 20 mM Tris-Hydrochlorid-Puffers (pH 6,8) homogenisiert, der 40 mM Natriumchlorid und 2% Dextran 940 enthält. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wird eine Lösung aus 5 mg Fluorescein-Isothiocyanat in 1 ml Tris-Hydrochlorid-Puffer zur Lösung gegeben. Die Mischung wird kurz beschallt und ungefähr 12 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation werden 20 ml eines 0,1 M Natriumphosphatpuffers (pH 7,6) in 0,1 M Natriumchlorid zur Kohlenstofflösung gegeben, die dann bei 4°C mit 15 000 Upm zentrifugiert wird. Dieser Schritt wird dreimal wiederholt und das resultierende Pellet in 20 ml Phosphatpuffer suspendiert.

30

2 mg Rinderserumalbumin werden zu 2 ml der Suspension von oben gegeben, die Mischung 6 Stunden lang inkubiert und dann dreimal der Zentrifugation unterworfen. Ein Überschuß an Glutaraldehyd (1%) wird hinzugefügt und nach einer dreistündigen Inkubation bei Raumtemperatur durch Zentrifugation entfernt. Eine Lösung aus 10 µg Tyroxin in genügend Dimethylformamid wird hinzugefügt, diese Mischung 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dann dreimal der Zentrifugation unterworfen. Das Endpellet, das in einem Puffer suspendiert wird, wie er in Beispiel 12 beschrieben ist, und dann kurz beschallt wird, kann bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt werden.

35

Patentansprüche

40

1. Immunchemische Assayvorrichtung, enthaltend:

a) ein Grundgerüst (20);

45

b) eine Anordnung, die sich auf dem Grundgerüst (20) befindet und umfaßt:

i) ein Reservepolster (10), das genügend Porosität und Volumen aufweist, um eine flüssige Probe, mit der der Assay durchgeführt werden soll, aufzunehmen und zu speichern;

50

ii) eine Membran mit Dichtwirkung (16), die entfernt vom Reservepolster angeordnet ist, wobei die Membran mit Dichtwirkung (16) genügend Porosität und Volumen aufweist, um einen wesentlichen Teil der Probe zu absorbieren, die in das Reservepolster (10) aufgenommen wurde; und

iii) wenigstens eine Filterzone, die die Membran mit Dichtwirkung (16) und das Reservepolster (10) verbindet und berührt, wobei die Filterzone:

(1) eine Oberfläche des Reservepolsters (10) berührt, die in Bezug auf das Volumen des Reservepolsters ausreichend klein ist, um den Fluß der flüssigen Probe vom Reservepolster zur Filterzone zu dosieren; und

55

(2) in der Lage ist, den Fluß eines jeden spezifischen Ligand-Rezeptor-Komplexes in der Probe vom Reservepolster (10) zur Membran mit Dichtwirkung (16) zu gestalten, während sie den Fluß größerer Komponenten, die sich dann in der Probe befinden, verhindert; und

c) wenigstens eine immobilisierte Substanz, die sich auf wenigstens einer Zone der Membran mit Dichtwirkung (16) befindet und die Assay-Anzeige (18) definiert, wobei die immobilisierte Substanz in der Lage ist, einen spezifischen Ligand-Rezeptor-Komplex, den die Probe enthält, zu binden, um die Assay-Anzeige zu bilden.

60

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Grundgerüst (20) aus Kunststoff oder Glas ist.

65

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Reservepolster (10) sich über das Grundgerüst (20) ausdehnt.

4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein Reagenz, das einen spezifischen Ligand-Rezeptor-Komplex erzeugen kann, gleichmäßig in und auf wenigstens einem Teil

der Filterzone sich befindet.

5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagenz einen Marker trägt.

6. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Marker ein direkter Marker ist.

7. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Marker ein Metallsol, ein Nicht-Metallsol, ein Farbstoffsol oder ein Farbindikator ist oder aus Latexpartikeln besteht.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Marker ein Kohlenstoffsol ist.

9. Vorrichtung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Marker ein indirekter Marker ist.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, insbesondere 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagenz und die immobilisierte Substanz Ligand-bindende Moleküle sind.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, insbesondere 4, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens das Reagenz oder die immobilisierte Substanz ein monoklonaler Antikörper ist.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, insbesondere 4, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens das Reagenz oder die immobilisierte Substanz ein polyklonaler Antikörper ist.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die immobilisierte Substanz ein Ligand ist.

14. Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die immobilisierte Substanz ein Antigen oder Hapten ist.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Filterzone umfaßt:

20. a) wenigstens ein erstes Filterelement (12), das auf dem Grundgerüst (20) so angeordnet ist, daß es an das Reservepolster (10) grenzt und eine Oberfläche des Reservepolsters (10) berührt, die in Bezug auf das Volumen des Reservepolsters (10) ausreichend klein ist, um den Fluß der flüssigen Probe vom Reservepolster (10) zum ersten Filterelement (12) zu dosieren; und

25. b) ein zweites Filterelement (14), das auf dem Grundgerüst (20) so angeordnet ist, daß es an jedes erste Filterelement (12) grenzt und vom Reservepolster (10) entfernt steht, wobei das zweite Filterelement (14) in der Lage ist, das Durchfließen eines jeden spezifischen Ligand-Rezeptor-Komplexes in der Probe zu gestalten, aber das Durchfließen größerer Komponenten, die sich dann in der Probe befinden, zu verhindern.

16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein Reagenz, das einen spezifischen Ligand-Rezeptor-Komplex erzeugen kann, gleichmäßig in und auf wenigstens einem Teil des ersten Filterelements (12) sich befindet.

30. 17. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß sowohl das Reservepolster (10), als auch das erste Filterelement (12), als auch das zweite Filterelement (14), als auch die Membran mit Dochtwirkung (16) aus mikroporösem Membranmaterial bestehen.

35. 18. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß jede mikroporöse Membran aus Nylon, Zellulosematerial, einem Polysulfon, Polyvinylidendifluorid oder aus einem Polyester besteht.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß sich ein Additiv auf dem ersten Filterelement (12) befindet, das in der Lage ist, die Herstellung oder das Binden der spezifischen Ligand-Rezeptor-Komplexe zu verstärken.

40. 20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 19, gekennzeichnet durch eine feuchtigkeits-undurchlässige Hülle (222), die die Vorrichtung umgibt, wobei die Hülle beinhaltet:

45. a) eine Öffnung (224) in der Hülle (222), deren umgebende, obere Oberfläche gebogen ist und sich nach unten ausdeht, so daß ein schalengleiches Aufnahmegeräß gebildet ist, das am Reservepolster (210) endet und fest mit einem Teil des Reservepolsters (210) verbunden ist, wobei die Öffnung (224) in der Lage ist, die flüssige Probe aufzunehmen und das Fließen der flüssigen Probe auf das Reservepolster (210) hinauf zu dosieren, und

50. b) eine Vorrichtung, mit der die Assay-Anzeigezone (218), die auf der Zone angeordnet ist, mit dem Auge überprüft werden kann.

21. Immunchemisch aktiver Marker, gekennzeichnet durch feine Kohlenstoffrührpartikeln, auf denen eine Komponente adsorptiv immobilisiert ist, die entfernt vom Adsorptionsort mit einem immunologisch aktiven Liganden oder Ligand-bindenden Molekül endet.

55. 22. Immunchemisch aktiver Marker nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente aus immunologisch aktiven Haptenen, Antigenen, oder Antikörper besteht, die auf der Oberfläche des Kohlenstoffrührs des adsorbiert sind.

23. Immunchemisch aktiver Marker nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente den immunologisch aktiven Liganden oder Ligand-bindende Moleküle beinhaltet, die über ein Kupplungsreagenz kovalent verbunden sind, und das Kupplungsreagenz auf der Oberfläche des Kohlenstoffrührs adsorbiert ist.

60. 24. Immunchemisch aktiver Marker nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß das Kupplungsreagenz ein Imid, Azid, Isothiocyanat, ein Imidoester oder ein Dialdehyd ist.

25. Immunchemisch aktiver Marker nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Kupplungsreagenz Maleimid, Succinimid, Phenylazid, Glutaraldehyd oder N-Hydroxysuccinimidester ist.

65. 26. Immunchemisch aktiver Marker nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Kupplungsreagenz ein Isothiocyanat ist.

27. Immunchemisch aktiver Marker nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Isothiocyanat Phenylisothiocyanat, 4, 4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure, 4-N,N-Dimethylaminoazobenzol-4'-isothiocyanat, Fluorescein-Isothiocyanat oder Rodaminisothiocyanat ist.

28. Immunchemisch aktiver Marker nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Kupplungsreagenz Phenylisothiocyanat ist.

29. Immunchemisch aktiver Marker nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Kupplungsreagenz 4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure ist. 5

30. Immunchemisch aktiver Marker nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Kupplungsreagenz 4-N,N-Dimethylaminoazobenzol-4'-isothiocyanat ist. 10

31. Immunchemisch aktiver Marker nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Isothiocyanat Fluorescein-Isothiocyanat ist. 15

32. Immunchemisch aktiver Marker nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Kupplungsreagenz Rodaminisothiocyanat ist. 15

33. Immunchemisch aktiver Marker nach einem der Ansprüche 21 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß die feinen Kohlenstofffrußpartikeln und die immobilisierte Komponente, die auf den Kohlenstofffrußpartikeln adsorbtiv immobilisiert ist, mit Polyethylenglykol überzogen sind, das ein Molekulargewicht von ungefähr 200 bis ungefähr 20 000 aufweist, oder mit Dextran bedeckt sind, das ein Molekulargewicht von ungefähr 10 000 bis ungefähr 500 000 aufweist. 20

34. Immunchemisch aktiver Marker nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß das Dextran ein Molekulargewicht von ungefähr 10 000 bis ungefähr 50 000 aufweist. 25

35. Immunchemisch aktiver Marker nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß das Polyethylenglykol ein Molekulargewicht von ungefähr 5000 bis ungefähr 12 000 aufweist. 25

36. Immunchemisch aktiver Marker nach einem der Ansprüche 21 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente den immunochemisch aktiven Ligand oder Ligand-bindende Moleküle beinhaltet, die an ein Protein gebunden sind, und das Protein auf der Oberfläche des Kohlenstofffrußes adsorbiert ist. 30

37. Immunchemisch aktiver Marker nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß der immunologisch aktive Ligand oder die Ligand-bindenden Moleküle an das Protein über eine immunologische Bindung kovalent gebunden sind. 30

38. Immunchemisch aktiver Marker nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß der immunologisch aktive Ligand oder die Ligand-bindenden Moleküle an das Protein über ein Kupplungsreagenz kovalent gebunden sind. 35

39. Immunchemisch aktiver Marker nach einem der Ansprüche 21 bis 38, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente den immunologisch aktiven Liganden oder die Ligand-bindenden Moleküle beinhaltet, die an ein Protein gebunden sind, wobei das Protein an ein Kupplungsreagenz kovalent gebunden ist und das Kupplungsreagenz auf der Oberfläche des Kohlenstofffrußes adsorbiert ist. 35

40. Immunchemisch aktiver Marker nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß der immunologisch aktive Ligand oder die Ligand-bindenden Moleküle an das Protein über ein zweites Kupplungsreagenz kovalent gebunden sind. 40

41. Wäßrige Suspension eines immunchemisch aktiven Markers nach einem der Ansprüche 21 bis 40. 40

42. Wäßrige Suspension nach Anspruch 41, gekennzeichnet durch wenigstens einen Puffer, der einen pH aufweist, bei dem der immobilisierte, immunologisch aktive Ligand stabil ist, und der in den Bereich von ungefähr 6 bis 9 fällt. 45

43. Wäßrige Suspension nach Anspruch 42, gekennzeichnet durch wenigstens einen Puffer, der einen pH von ungefähr 6,5 bis 8,5 aufweist. 45

44. Verfahren zur Herstellung eines immunchemisch aktiven Markers nach einem der Ansprüche 23 bis 40, gekennzeichnet durch das Binden des immunologisch aktiven Liganden oder der Ligand-bindenden Moleküle an die feinen Kohlenstofffrußpartikeln, indem man ein Kupplungsreagenz, gleichzeitig oder hintereinander,

- i) mit dem immunologisch aktiven Liganden oder den Ligand-bindenden Molekülen kovalent reagieren läßt und
- ii) auf den feinen Kohlenstofffrußpartikeln adsorbieren läßt. 50

45. Verfahren nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, daß der immunchemisch aktive Marker mit einer wäßrigen Lösung eines Polyethylenglykols in Kontakt gebracht wird, das ein Molekulargewicht von ungefähr 100 bis ungefähr 20 000 aufweist. 55

46. Verfahren nach Anspruch 44 und/oder 45, dadurch gekennzeichnet, daß die feinen Kohlenstofffrußpartikeln mit einer wäßrigen Lösung eines Dextrans in Kontakt gebracht werden, das ein Molekulargewicht von ungefähr 10 000 bis ungefähr 500 000 aufweist. 55

47. Verfahren nach einem der Ansprüche 44 bis 46, dadurch gekennzeichnet, daß der immunologisch aktive Ligand oder die Ligand-bindenden Moleküle an die feinen Kohlenstofffrußpartikeln über ein Imid, Azid, Isothiocyanat, Imidoester oder über einen Dialdehyd gebunden sind. 55

48. Verfahren nach Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, daß der immunologisch aktive Ligand oder die Ligand-bindenden Moleküle an die feinen Kohlenstofffrußpartikeln über ein Isothiocyanat gebunden sind. 60

49. Verfahren nach einem der Ansprüche 44 bis 47, dadurch gekennzeichnet, daß der immunologisch aktive Ligand oder die Ligand-bindenden Moleküle an die feinen Kohlenstofffrußpartikeln über Phenylisothiocyanat, 4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure, 4-N,N-Dimethylaminoazobenzol-4'-isothiocyanat, Fluorescein-Isothiocyanat oder Rodaminisothiocyanat gebunden sind. 60

50. Verfahren nach einem der Ansprüche 44 bis 49, dadurch gekennzeichnet, daß der gebundene, immunologisch aktive Ligand oder die gebundenen Ligand-bindenden Moleküle und die feinen Kohlenstofffrußpartikeln in einem wäßrigen Medium suspendiert sind, das auf einen pH gepuffert ist, der in den Bereich von ungefähr 6 bis ungefähr 9 fällt, und bei dem der immobilisierte, immunologisch aktive Ligand oder das immobilisierte, Ligand-bindende Moleköl stabil ist. 65

51. Verfahren nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Suspension mit wenigstens einem biologisch verträglichen, ionischen oder nicht-ionischen Tensid behandelt ist.

DE 40 37 724 A1

52. Immunchemische Testvorrichtung, die eine Reaktion zwischen einem immunologisch aktiven Liganden oder Ligandbindenden Molekülen und einem Analyten ausnützt, gekennzeichnet durch die Verwendung eines immunchemisch aktiven Markers, der feine Kohlenstofsrückspartikeln aufweist, auf denen eine Komponente adsorptiv immobilisiert ist, die entfernt vom Adsorptionsort mit einem immunologisch aktiven Liganden oder Ligand-bindenden Molekül der Reaktion endet.

5 53. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 52, gekennzeichnet durch eine feuchtigkeits-undurchlässige Hülle (522), die die Vorrichtung umgibt, wobei die Hülle (522) aufweist:

- 10 a) eine erste Öffnung (524) in der Hülle (522), deren umgebende, obere Oberfläche gebogen ist und sich nach unten ausdehnt, so daß ein schalengleiches Aufnahmegeräß gebildet ist, das am Reservepolster (510) endet und fest mit einem Teil des Reservepolsters (510) verbunden ist, wobei die erste Öffnung (524) in der Lage ist, die Flüssigkeit aufzunehmen und das Fließen der Flüssigkeit auf das Reservepolster (510) hinauf zu dosieren,
- 15 b) eine zweite Öffnung (530) in der Hülle (522), direkt über dem zweiten Filterelement (514), wobei mit der zweiten Öffnung (530) eine Probe direkt auf das zweite Filterelement (514) aufgegeben werden kann, und
- c) eine Vorrichtung, mit der die Assay-Anzeigezone (518), die auf der Zone angeordnet ist, mit dem Auge überprüft werden kann.

20 Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

25

30

35

40

45

50

55

60

65

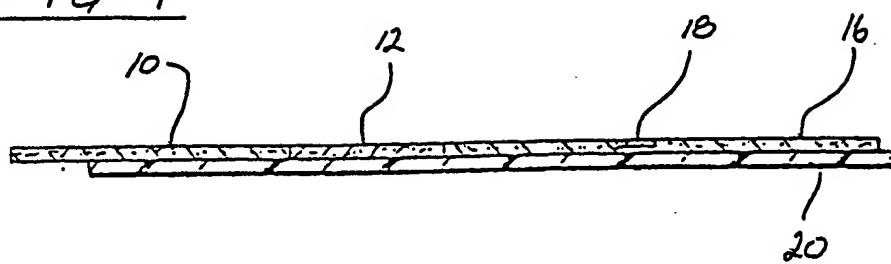
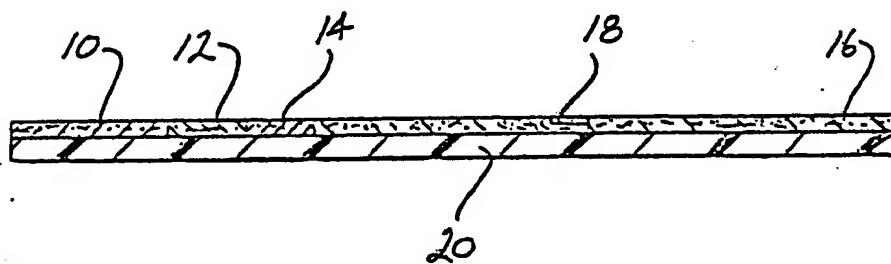
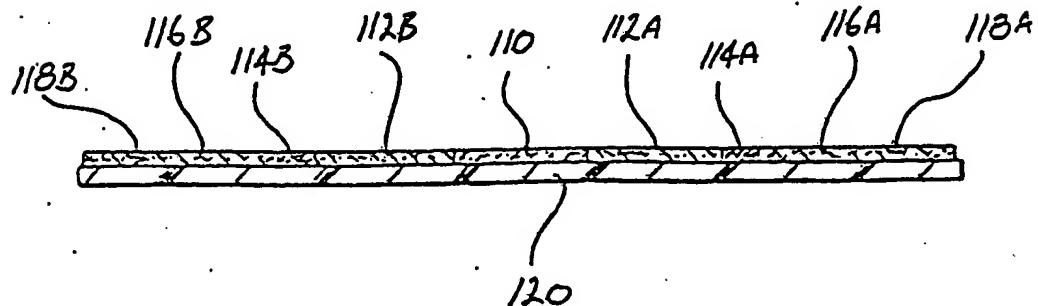
FIG-1FIG-2FIG-3

FIG-4

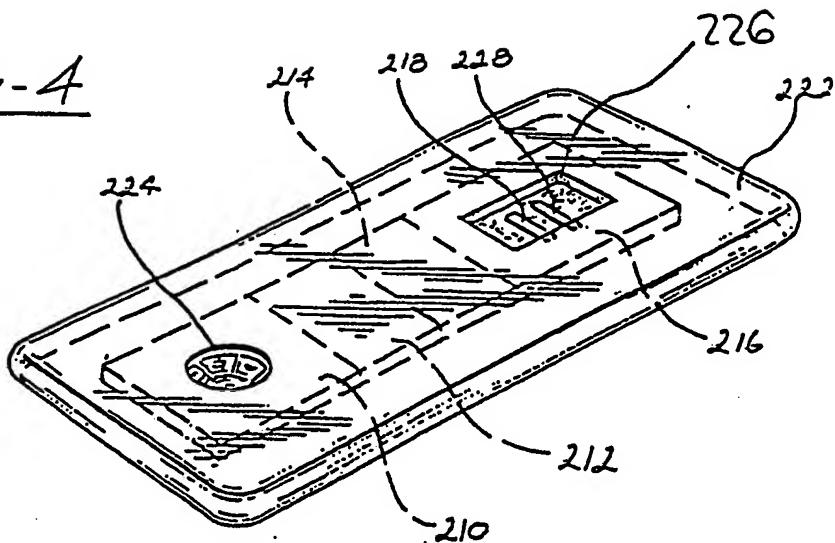


FIG-5

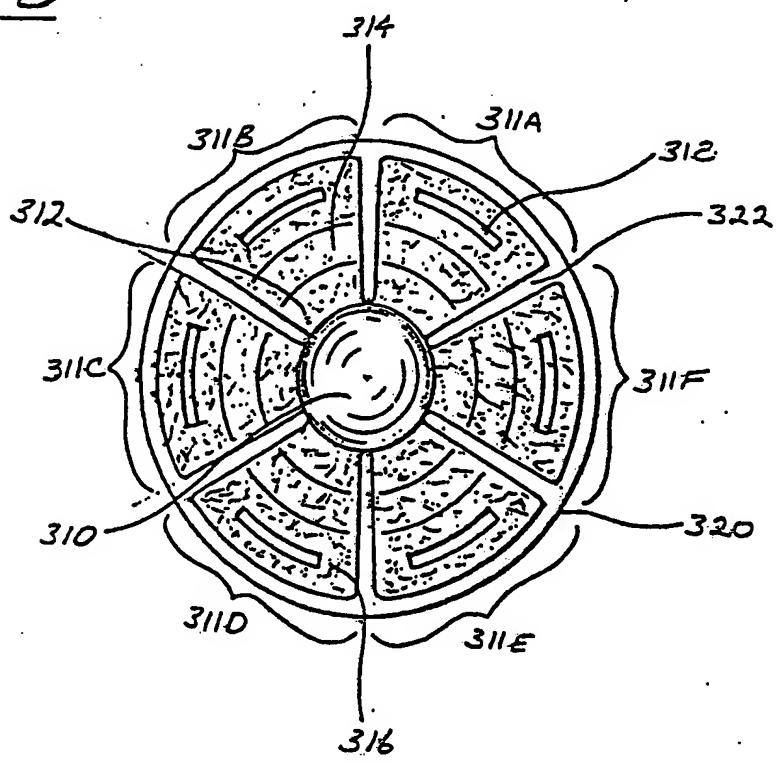


FIG. 6

